

DÉFICE DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE EM 10 FAMÍLIAS RESIDENTES NO NORTE DE PORTUGAL

Elísio Costa*, José Barbot*, Eduarda Coimbra**, Luciana Pinho***, Benvindo Justiça***, José Manuel Cabeda***

Resumo: O défice de Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia eritrocitária conhecida mais comum, atingindo mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. Portugal é um País de baixa prevalência da doença sendo no entanto de registar a forte imigração de áreas endémicas, particularmente para o Sul do País.

Neste trabalho são apresentados e discutidos, os resultados do estudo de alguns parâmetros bioquímicos e do estudo a nível genético, efectuado em 10 famílias com défice de G6PD, num total de 13 indivíduos afectados (12 do sexo masculino e 1 do sexo feminino) e de 10 heterozigotas, referenciados a dois Hospitais Centrais do Norte (Hospital Geral de Santo Antonio e Hospital de Crianças Maria Pia). Dos indivíduos afectados, 3 pertenciam à classe I e 10 à classe III, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde.

Palavras-chave: G6PD; mutações; anemias hemolíticas. Norte de Portugal.

Summary: The glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) is the most common enzymopathy known, affecting more than 400 million people world-wide. Portugal is a low prevalence country, nevertheless it must be noted the strong immigration from endemic areas, particularly to the South of Portugal.

This report brings out and evaluates the results of some biochemical parameters and of a genetic study, made in 10 families with G6PD deficiency, in which there were 13 affected individuals (12 males and 1 female) and 10 heterozygotic individuals. They were referred to two Northern Central Hospitals (Hospital Geral Santo Antonio and Hospital de Crianças Maria Pia). Of the affected individuals, three were classified as class I and ten as class III, according to the WHO.

Key-words: G6PD; mutations; haemolytic anemias; North of Portugal.

INTRODUÇÃO

Fisiopatologia

O défice de Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD) é a mais comum das enzimopatias eritrocitárias conhecidas, atingindo mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. A descoberta desta entidade nos anos 50 fez-se no contexto da investigação de crises hemolíticas desencadeadas pela primaquina (droga com potencial oxidativo), no tratamento anti-malárico em população de raça negra (1).

A G6PD é uma enzima que actua na via aeróbia do catabolismo da glicose (2), transformando a glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato com redução simultânea do NADP a NADPH. Esta via é responsável pelo catabolismo de apenas 5% do total de glicose consumida pelo eritrócito, o que torna evidente não ser esta a via essencial no catabolismo da glicose, como forma de obtenção de energia. A sua principal importância é assim a obtenção da forma reduzida de nicotina-adenina dinucleotido (NADPH), que entra no ciclo da glutatona. A sua função nas células do organismo é a de preservar os grupos sulfídricos de numerosas proteínas e de proteger as células em geral contra efeitos oxidativos. Esta função é particularmente pertinente no eritrócito, dada a acção oxidativa dos radicais livres de oxigénio, produzidos em grande quantidade nestas células (1, 2).

O gene da G6PD está localizado no cromossoma X (banda Xq28) (1), compreendendo 13 exões e 12 intrões distribuídos por 20 Kb de DNA genómico, pelo que em caso de deficiência a morbilidade incide fundamentalmente em indivíduos do sexo masculino (hemizigotia). As mulheres heterozigotas comportam-se como portadoras podendo, no entanto, apresentar manifestações clínicas minor.

Em termos clínicos existem fundamentalmente dois tipos de variantes (1, 2, 3, 4, 5):

- variantes que cursam com crises hemolíticas apenas em circunstâncias que impliquem "stress" oxidativo, com prevalência elevada em determinadas áreas geográficas.
- variantes que cursam com hemólise crónica de maior ou menor gravidade, susceptíveis de agudização em situações que impliquem igualmente "stress" oxidativo.

A classificação das variantes, de uma forma geral mais aceite e recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde), procura conjugar a expressão clínica com a actividade residual da enzima (1), dada a boa relação existente entre estas duas variáveis (Quadro I). De referir que existe uma sobreposição na actividade residual da enzima entre a classe I e II e por outro lado uma sobreposição na expressão clínica das variantes da classe II e III.

Epidemiologia

A deficiência em G6PD, é uma patologia com distribuição a nível mundial desigual (1), com países com uma frequência que atinge os 25%, e outros cuja frequência é inferior a 0,5% (Fig. 1).

Em Portugal, existe somente um estudo de prevalência desta patologia (6), efectuado em 13785 rapazes em idade de cumprir o serviço militar, que aponta para uma prevalência de 0,51%, com distribuição geográfica desigual com maior prevalência no Sul do país. Este estudo incluiu 6 distritos do Norte de Portugal, 4 deles com

* - Serviço de Hematologia do Hospital de Crianças Maria Pia
** - Serviço de Pediatria do Hospital Geral de Santo António
*** - Serviço de Hematologia do Hospital Geral de Santo António

Quadro I - Classificação das variantes segundo a expressão clínica e a actividade residual da enzima

Classe	Expressão Clínica	Actividade Residual da Enzima
I	Severa (AHNEC)	< 20 %
II	Moderada	< 10 %
III	Moderada	10 - 60 %
IV	Ausente	100 %
V	Ausente	> 100 %

Correspondência:

Téc. Elísio Costa
Hospital de Crianças Maria Pia
Av. da Boavista, 827
4050 Porto

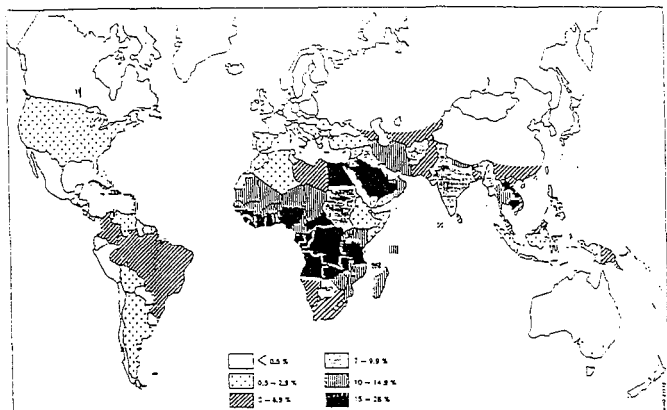


Fig. 1 - Distribuição geográfica do déficit de G6PD.

uma prevalência de 0% (Viana do Castelo, Vila Real, Braga e Bragança) e 2 com uma prevalência de 0,05% e 0,12% (Porto e Viseu respectivamente).

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial de déficit de G6PD, é efectuado por doseamento enzimático (2). Existem no entanto situações particulares, em que é pertinente a existência de testes suplementares de diagnóstico (testes citoquímicos), particularmente no esclarecimento da condição de portadoras em indivíduos do sexo feminino.

A mulher possui dois cromossomas X, o que não significa que produza o dobro do material genético relativamente ao homem que só tem um cromossoma X. Isto é explicado pela teoria de Lyon, que afirma que numa fase precoce da embriogénese um dos cromossomas X, paterno ou materno, é inactivado (corpúsculo de Barr) funcionalmente de uma forma aleatória, fazendo com que existam células que expressem funcionalmente apenas o cromossoma X materno ou em alternativa o cromossoma X paterno, sendo esta característica manifestada em toda a descendência celular. Portanto o que se passa nas heterozigotas é um fenómeno do tudo ou nada, ou seja, não são todas as células que apresentam actividade diminuída, mas sim existem duas populações de células: uma com actividade normal e outra com actividade diminuída. É neste princípio que se baseiam os testes citoquímicos, em que são selectivamente coradas as células não deficientes em G6PD.

Estes testes são no entanto falíveis na presença de lionizações extremas, em que somente o estudo a nível molecular é conclusivo (1, 2).

Variantes

Nos últimos 30 anos, foram publicadas e referenciados mais de 400 variantes de déficit de G6PD, com base nas suas características bioquímicas nomeadamente (3, 4, 5):

- actividade enzimática
- mobilidade electroforética
- constante de Michaelis para a G6P e NADP
- pH ótimo de actividade
- estabilidade ao calor

A partir de 1986, com a clonagem do gene da G6PD, o estudo das mutações e polimorfismos iniciou-se desta vez a nível genético. Estes estudos vieram demonstrar uma menor heterogeneidade das variantes previamente classificadas do ponto de vista bioquímico. Verificou-se que variantes diferentes do ponto de vista bioquímico, correspondiam à mesma mutação a nível molecular e que o contrário também era verdade, ou seja, mutações diferentes a nível molecular tinham as mesmas características bioquímicas.

Esta menor heterogeneidade das variantes é atribuída por alguns autores (3, 7), à sobrevalorização das diferenças encontradas na classificação a nível bioquímico, que em algumas situações se deveram a diferenças nos reagentes comerciais utilizados, no grau de

desnaturação da enzima durante o processo de armazenamento e/ou purificação e no tipo de aparelhagem utilizada.

Um exemplo tipicamente descrito (3) onde esta situação é evidente, é a caracterização a nível bioquímico de duas variantes, Chicago e Cornell, que mais tarde e já na era da genética molecular, se verificou tratar-se de dois membros de uma mesma família, portadores da mesma mutação (variante A-) (Quadro II).

Com o desenvolvimento das técnicas de PCR e das técnicas de sequenciação de fragmentos de DNA amplificados, foi possível muito rapidamente a identificação até ao momento de 97 diferentes mutações a nível molecular (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

As mutações encontradas são sobretudo mutações pontuais do tipo "missense" (15), que condicionam a substituição de apenas um amino ácido. Foram ainda descritos cinco casos em que coexistiam duas, e um outro em que coexistiam três mutações "missense". Só foi descrita uma mutação tipo nonsense (12) (Georgia) num indivíduo heterozigoto, não existindo referência a este tipo de mutação em hemizigotia.

Nunca foram encontradas deleções de grandes porções do gene, nem mutações que alterassem significativamente o seu "splicing" normal. Foram encontradas cinco mutações deleccionais (7), três com deleção de três pares de bases (Sunderland, Urayasu e Tsukui), uma de seis pares de bases (Stonybrook), e uma outra (a deleção mais extensa conhecida) de vinte e quatro pares de bases (Nara) (10). De referir que nestas mutações, as bases mutadas são sempre múltiplos de 3, pelo que não é alterada a ordem de leitura. Só existe referência a uma mutação que altere o splicing normal do gene. Esta mutação no intrão 10 (Vansdorf), origina uma alteração a nível protéico que não está ainda totalmente esclarecida (12).

MATERIAL E MÉTODOS

A população a estudar compreendeu 23 indivíduos (13 doentes e 10 portadoras), pertencentes a 10 famílias com déficit de G6PD, referenciados ao Serviço de Hematologia do HGSA e ao Serviço de Hematologia do HCMP.

O diagnóstico foi confirmado em todos os doentes, por doseamento enzimático, pelo método recomendado pela OMS, que se baseia na redução do NADP a NADPH, reacção com pico de absorvância a 340 nm (2).

A identificação de portadoras foi efectuada por doseamento enzimático e por teste de eluição citoquímica (2, 16).

A determinação da mobilidade electroforética da enzima foi efectuada em tiras de acetato de celulose, em tampão Tris-EDTA, pH-7,5. A banda correspondente à G6PD foi corada e a mobilidade quantificada (17).

A análise a nível molecular, nas variantes da classe III, incidiu em primeiro lugar na identificação das mutações A- (376 A→G/ 202 G→A; 376 A→G/680 G→T; 376 A→G/ 968 T→C).

Quadro II - Caracterização a nível bioquímico da variante de Chicago e da variante de Cornell

	Chicago	Cornel
Mobilidade electroforética (% do normal)		
Tris	100	-
EBT	100	100
Fosfato	92	100
Actividade enzimática (% do normal)	17,5	5
Km G6P (μmol/L)	67	55
Km NADP (μmol/L)	3,4	11,8
utilização de 2-deoxy-G6P (%)	<4	<4
utilização de deamino-NADP (%)	-	51
estabilidade ao calor	↓↓↓	↓↓↓
pH ótimo	Normal	Normal

O DNA genómico foi isolado, do sangue total, com o kit Qiamp Blood (cat. da 29106 Quiagen Inc., Chatsworth., USA).

Os exões 4, 5, 7 e 9 foram amplificados por PCR (polimerase Chain Reaction), utilizando "primers" específicos (Quadro III) (14). Os amplicons assim obtidos foram submetidos a uma reacção de restrição, utilizando as enzimas apropriadas (Quadro III), nas condições de reacção recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Os fragmentos assim obtidos, foram separados por electroforese em gel de agarose e visualizados num transiluminador UV, depois de corados com Brometo de Etídio. As fotografias foram efectuadas com películas Polaroid 667 (Sigma USA). Fragmentos de tamanho reduzido (<100 pb), foram separados em gel de poliacrilamida a 8% e corados igualmente com Brometo de Etídio.

Nos casos da classe I, relacionados com Anemia Hemolítica Não Esferocítica Crónica (AHNEC), procuramos confirmar 2 variantes que à partida já tinham sido identificadas pelo Departamento de Hematologia do Royal PostGraduate Medical School, variante *Nara* e a variante *Tomah*. A demonstração da variante *Nara* (delecção de 24 pares de bases no exão 9), foi efectuada utilizando os "primers" 5'-GTCAAGGTGTTGAAATGCATCT e 3'-GGTCAAACCGTCGG CAGGAGA, e da observação do tamanho do fragmento amplificado (10). A demonstração da variante de *Tomah* (mutação missense-1153 T→C, no exão 10) foi efectuada utilizando os "primers" 5'-ACCCAA GGAGCCCATTC e 5'CCCGCCCTCCACACTGCTCC, sendo o fragmento obtido cortado com enzima de restrição (Fnu4HI) (9).

RESULTADOS

Foram reunidas 10 famílias, correspondendo a 13 indivíduos deficientes em G6PD. Destes, 3 tinham anemia hemolítica não esferocítica crónica (classe I da classificação da OMS), e os restantes pertenciam à classe III, da mesma classificação (Quadro IV).

Os 3 indivíduos com AHNEC, eram de raça caucasiana. Dois deles com actividade enzimática indetectável, pelo que não nos foi possível visualizar a banda correspondente à G6PD, na determinação da mobilidade electroforética. O outro caso, apresentou uma actividade enzimática de 12%, com 94% de mobilidade electroforética. Nos casos 3 e 11 do quadro IV as mutações a nível molecular já tinham sido identificadas no Departamento de Hematologia do Royal PostGraduate Medical School em Londres. Confirmamos esses resultados; no caso 3 trata-se de uma mutação delecional de 24 pares de bases (del 953-976) (Fig. 2) e no caso 11 de uma mutação missense no exão 10 (1153 T→C). No caso 10, o estudo a nível molecular já efectuado ainda não nos permitiu identificar a mutação em causa.

Relativamente às 10 situações pertencentes à classe III da OMS, de referir que têm uma mobilidade electroforética rápida relativamente à variante B. Sete delas referem-se a indivíduos de raça negra ou mestiça, e correspondem todas à mutação 376 A→G/202 G→A (Fig. 3 e 4). Os 3 indivíduos restantes são de raça caucasiana, 2 deles têm a mutação 376 A→G/968 T→C (Fig. 5) e outro a mutação 376 A→G/202 G→A.

Foi ainda possível estudar 10 portadoras de défice de G6PD. Os resultados dos doseamentos enzimáticos e do teste de eluição citoquímica estão representados no Quadro V. Das situações que em

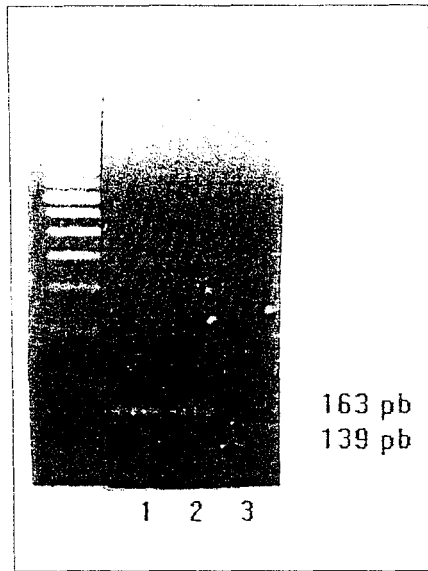


Fig. 2 - Delecção de 24 pares de bases no exão 9 do gene da G6PD. Os individuos 1 e 2 apresentam o gene normal (163pb), enquanto o individuo 3 apresenta um fragmento delectado (139pb).

hemizigotia estão relacionados com a classe III, apenas uma apresentou actividade enzimática severamente reduzida (18% do normal). Das restantes quatro, uma apresentou actividade normal (110%), e três actividades moderadamente reduzidas (em média 68% do normal [65% a 73%]). As situações que em hemizigotia estão relacionados com a classe I, apresentaram actividade enzimática próxima do normal (apenas uma apresentou actividade inferior a 75%). Todas estas portadoras apresentavam eritrocitos deficientes em G6PD (10 a 42%).

DISCUSSÃO

A baixa prevalência descrita desta patologia no Norte de Portugal, foi de alguma forma confirmada pelo reduzido número de casos reunidos, em dois hospitais centrais do Norte.

Das 10 famílias reunidas, 5 eram de origem Portuguesa, 4 de origem Africana e uma de origem Sul Americana. As mutações da classe I foram encontradas apenas em famílias de origem Portuguesa. As duas situações da classe III encontradas nas famílias de origem Portuguesa, correspondem a variantes A- em que a mutação 376 A→G está associada à mutação 968 T→C. Esta associação é menos comum dentro das variantes A-. As 5 situações da classe III, encontradas em famílias de origem não Portuguesa, são variantes A- em que a mutação 376 A→G está associada à mutação 202 G→A. Esta associação é a mais frequente dentro das variantes A-.

Se compararmos estes resultados com os publicados recentemente (Quadro VI), por Weiming Xu et al em 1995, num artigo que analisa as mutações encontradas em diferentes grupos étnicos, verificamos uma certa analogia com as Ilhas Canárias, onde a mutação

Quadro III - Reagentes utilizados na detecção das mutações A- por PCR-RFLP do gene da G6PD

PCR Exon #	Mutação	"Primer" - 5'	"Primer" - 3'	Enzima de restrição	Fragmento não cortado	Fragmento cortado Normal	Fragmento cortado Mutação
I	4 202 G→A	5'GTGGCTGTTCGGGATGGCCTTCTG	3'GTTTGTCTCACTCGGGAAGAAGTTC	NlaIII	109	109	63/46
II	5 376 A→G	5'TGGCCAGTACGATGATGCAG	3'TGGCGGAGAAGATGGACCCG	FokI	90	90	58/32
III	7 680 G→T	5'ACATGTGGCCCCCTGCACCAC	3'GTCCCACCGTCTCCTCAGTG	BstNI	242	213/29	98/115/29
IV	9 968 T→C	5'TCCCTGCACCCCAACTCAAC	3'CGGGTCTCCGTCTTGACC	NciI	282	282	162/120

Quadro IV - Resumo das mutações, características bioquímicas, origem familiar e geográfica para os 13 doentes com déficit de G6PD

Família	Caso	Origem racial	Actividade enzimática (% do normal)	Classe da OMS	Mobilidade eletroforética (% do normal)	Mutação a nível genético
1	1	Mestiça- Angola ✓	40	III	109	376A→G / 202G→A
2	2	Negra-São Tomé e Príncipe ✓	17	III	112	376A→G / 202G→A
3	3	Caucasiano- Portugal	Indetectavel	I	a)	del 953-976 b)
4	4	Caucasiano- Portugal ✓	15	III	109	376 A→G / 968T→C
5	5	Caucasiano- Portugal ✓	c)	III	c)	376 A→G / 968T→C
6	6	Mestiça- Angola ✓	20	III	112	376A→G / 202G→A
6	7	Mestiça- Angola ✓	11	III	112	376A→G / 202G→A
6	8	Mestiça- Angola ✓	10	III	112	376A→G / 202G→A
7	9	Caucasiano- Venezuela ✓	5	III	113	376A→G / 202G→A
8	10	Caucasiano- Portugal	Indetectavel	I	a)	d)
9	11	Caucasiano- Portugal	12	I	94	1153 T→C b)
10	12	Negra - Zaire	23	III	108	376A→G / 202G→A
10	13	Negra - Zaire	24	III	108	376A→G / 202G→A

a) Não foi possível detectar a banda correspondente à G6PD dado a actividade enzimática ser indetectável; b) Estudo efectuado no Departamento de Hematologia do Royal PostGraduate Medical School em Londres e confirmado por nós; c) Só tivemos acesso ao DNA; d) Ainda não foi identificada a mutação.

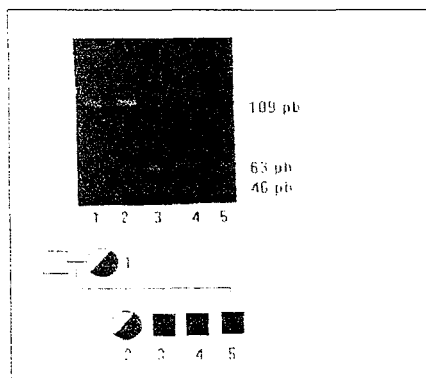


Fig. 3 - Detecção da mutação 202 G→A no exão 4 do gene da G6PD. Os indivíduos 1 e 2 apresentam o gene normal (109 pb), bem como o gene mutado (corte de restrição originando bandas com 63 pb e 46pb. Note-se que a fraca intensidade da banda de 46 pb por vezes impossibilita a sua visualização com brometo de etideo). Os indivíduos 3, 4 e 5 apresentam apenas o gene mutado.

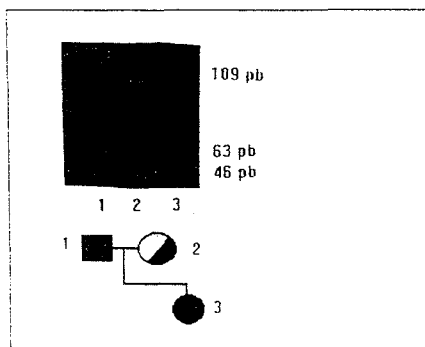


Fig. 4 - Detecção da mutação 202 G→A no exão 4 do gene da G6PD. O indivíduo 2 apresenta o gene normal (109 pb), bem como o gene mutado (ver legenda da fig 3). Os indivíduos 1 e 3 apresentam apenas o gene mutado.

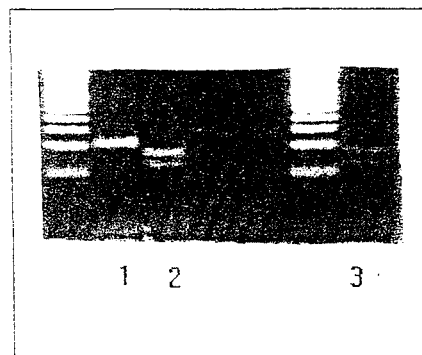


Fig. 5 - Detecção da mutação 968 T→C no exão 9 do gene da G6PD. O indivíduo 1 apresenta apenas o gene normal (fragmento não cortado com 282 pb). Os indivíduos 2 e 3 apresentam o gene mutado (fragmentos de restrição com 162pb e 120 pb).

Quadro V - Resumo da actividade enzimática e percentagem de eritrócitos com deficiência enzimática de G6PD nas 10 portadoras estudadas

Caso	Actividade enzimática (% do normal)	% de células deficientes em G6PD	Classe da OMS em hemizigotia
1	18	100	III
2	73	40	III
3	65	32	III
4	66	20	III
5	60	42	I
6	90	10	I
7	102	10	I
8	75	20	I
9	85	35	I
10	110	0	III

Quadro VI - Comparação das mutações em alguns grupos étnicos (adaptado da ref. 12)

	Grecia	Ilhas canárias	Republica Checa
Nº de individuos estudados	23	14	13
Mediterrânica (563 C→T)	19	0	0
A- (376A→G / 202G→A)	1	7	0
A- (376 A→G / 968T→C)	0	4	0
Outras mutações	3	3	13

Mediterrânica (563 C→T), não foi encontrada e onde a mutação A- (376 A→G/ 968 T→C) foi encontrada em 4 indivíduos.

As mutações relacionadas com as formas mais graves, que cursam com AHNEC, estão maioritariamente localizadas entre os resíduos 380 e 450, zona que durante muito tempo se pensou ser o local de ligação da enzima ao NADP⁺. Actualmente o modelo experimental

de N E Naylor et al de 1996 (11), relaciona estas mutações com os locais de ligação dimérica da enzima, o que explicaria a sua baixa estabilidade.

Contrariamente ao que acontece com a variante *Tomah* (1153 T→C), a variante *Nara* não se situa no local do gene onde estão condensadas a maioria das mutações que cursam com AHNEC. Isto, associado ao facto de se situar no local da mutação A- (968T→C), pode sugerir que a gravidade clínica desta situação poderá não estar directamente relacionada com o local da mutação, mas sim com as bases delectadas (11).

Relativamente à detecção do estado de heterozigotia, é de referir que nas 5 situações estudadas que em hemizigotia estão relacionadas com a classe III, o doseamento enzimático foi informativo em 3. Relativamente às outras 2 situações (caso 1 e 10 do quadro V) o doseamento enzimático, o teste de eluição citoquímica e a electroforese da enzima foram compatíveis com homozigotia. No caso 1 com deficiência e no caso 10 com normalidade. O estado de portadoras nestas situações só foi possível definir face ao resultado (Fig. 3 e 4) do estudo a nível genético. Uma possível explicação para estas discrepâncias consiste na presença de lionizações extremas ou seja que na embriogénese tenha ocorrido um desequilíbrio na inactivação dos cromossomas X, tendo o cromossoma X normal ou anormal sido desfavorecido, face ao outro cromossoma X. Esta hipótese poderia assim explicar tanto o caso 1 (lionização extrema no sentido da deficiência) como o caso 10 (lionização extrema no sentido da normalidade). O caso 1 pode ainda ser explicado pela presença de uma dupla heterozigotia. Nesta hipótese, o segundo cromossoma X possuiria uma mutação não detectada, o que ocasionaria a ausência de um gene da G6PD normal. Uma outra alternativa para o caso 1 consiste na existência de um corte de restrição incompleto. No entanto, o facto de as reacções de restrição terem sido efectuadas com excesso de enzima durante 18 horas, aliado à reprodutibilidade destes resultados leva-nos a favorecer as hipóteses anteriores. Como a frequência de lionizações extremas descrita é de 2% (1), uma mera análise de probabilidades leva-nos a favorecer a hipótese da dupla heterozigotia no caso 1, já que o caso 10 só pode ser explicado pela lionização extrema.

Em nenhum dos casos que em hemizigotia estão relacionados com a classe I, o doseamento enzimático foi totalmente informativo. No entanto, o teste de eluição citoquímica permitiu concluir da condição de portadoras.

O presente estudo permitiu assim estabelecer a relativa frequência das variantes A- na população residente no Norte de Portugal. De salientar em particular a frequência da mutação 376 A→G/968 T→C. Assim, em futuros testes genéticos de despiste desta patologia, estas mutações deverão ser prioritariamente testadas. De igual modo, a

detecção de portadoras em situações que cursam com AHNEC e em situações de doseamentos enzimáticos compatíveis com homozigotia deverá incluir um teste citoquímico, para despiste de desequilíbrios de lionização.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Luzzatto L, Nathan DG, Osby FA: Hematology of infancy and childhood. Philadelphia WB Sanders Company: 674-695, 1993.
- 2 - Dacie JV, Lewis SM: Practical Haematology. Edinburg. Churchill Livingstone: 195-225, 1991.
- 3 - Beutler E: The Genetics of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency. Seminars in haematology 27: 137-164, 1990.
- 4 - Beutler E: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase: New Perspectives. Blood 73: 1397-1401, 1989.
- 5 - Beutler E: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. The New England Journal of Medicine 324: 169-174, 1991.
- 6 - Martins MC, Olim G et al: Hereditary anaemias in Portugal: epidemiologic, public health significance and control. J Med Genet 30: 235-239, 1993.
- 7 - Vulliamy T, Beutler E, Luzzatto L: Variants of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Are Due to Missense Mutations Spread Throughout the Coding Region of the Gene. Human Mutation 2: 159-167, 1993.
- 8 - Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons JL, Prchal JT: Molecular Heterogeneity of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase A-. Blood 74: 2550-2555, 1989.
- 9 - Hirono A, Kuhl V et al: Identification of the binding domain for NADP+ of human Glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. Proc Natl Acad Sci 86: 10015-10018, 1989.
- 10 - Hirono A et al: G6PD Nara: A New Class I Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Variant With an Eight Amino Acid Deletion. Blood 82: 3250-3252, 1993.
- 11 - Naylor CE, Rowland P et al: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Mutations Causing Enzyme Deficiency in a Model of the Tertiary Structure of the Human Enzyme. Blood 87: 2974-2982, 1996.
- 12 - Xu W, Westwood B et al: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Mutations and Haplotypes in Various Ethnic Groups. Blood 85: 257-263, 1995.
- 13 - Brown KA: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and other enzyme defects. Laboratory Medicine 27: 390-395, 1996.
- 14 - Hirono A, Beutler E: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A-. Proc Natl Acad Sci 85: 3951-54, 1988.
- 15 - Beutler E, Vulliamy T, Luzzatto L: Hematologically important mutation: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. Blood Cells Molecules, and Diseases 22: 49-56, 1996.
- 16 - Costa E, Rodrigues M, Marques L, Barbot J: O Teste de Eluição Citoquímica na detecção de heterozigotas para défice de G6PD. Nascere e Crescer 4: 99-102, 1995.
- 17 - Giblett E, Anderson JE: Electrophoretic analyses of polymorphic red cell enzymes. In: Red Cell Metabolism: Beutler E. Churchill Livingstone, Edinburg: 108-123, 1986.